

## Экспериментальное изучение ферментативной устойчивости донорской роговицы, обработанной по методике УФ-кросслинкинга

Б.Э. Малюгин, С.А. Борзенко, З.И. Мороз, А.В. Шацких, М.В. Горохова  
ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, Москва

### РЕФЕРАТ

**Цель.** Изучить устойчивость донорской роговицы, консервированной в среде Борзенко-Мороз и обработанной по методике кросслинкинга, к коллагеназе.

**Материал и методы.** Объектом исследования служили донорские роговицы (n=24), которые были распределены по 4 группам. Все роговицы консервировались в среде Борзенко-Мороз в течение 24 часов до начала эксперимента по стандартной методике (2). Первая группа содержала только консервированные в среде Борзенко-Мороз донорские роговицы (n=6). Во вторую группу входили консервированные донорские роговицы с добавлением рибофлавина, обработанные по методике кросслинкинга (n=6). Третья группа была сформирована из консервированных донорских роговиц, обработанных коллагеназой: результат оценивался в динамике через 24 часа (n=3) и через 72 часа (n=3). Четвертая группа состояла из консервированных донорских роговиц с добавлением рибофлавина, после кросслинкинга обработанных коллагеназой: результат оценивался в динамике через 24 часа (n=3) и через 72 часа (n=3).

**Результаты.** Роговицы первой группы являлись контрольными, и по результатам СЭМ следует, что строма роговицы была представлена пластинами строго ориентированных волокон белка коллагена. В строме роговиц второй группы отмечались утолщение коллагеновых фибрилл, уменьшение расстояния между пластинами коллагена, бо-

лее компактная укладка пластин под воздействием рибофлавина и ультрафиолета по сравнению с контрольной группой. В роговицах третьей группы после воздействия коллагеназы через 24 часа также отмечалось разрушение коллагеновых фибрилл, нарушение продольной направленности пластин коллагена, нарушение структуры белка, визуализировались оставшиеся коагулированные части белковой фракции. Через 24 часа фибриллы коллагена роговиц четвертой группы, обработанные рибофлавином, ультрафиолетом и коллагеназой, сохраняли свою структуру и направленность, прослеживалась более компактная укладка пластин коллагена по сравнению с роговицами третьей группы. Динамическая оценка действия коллагеназы в третьей и четвертой группах через 72 часа показала, что в 4 группе воздействие коллагеназы на роговицу было минимальным с сохранением структуры и направленности пластов коллагена.

**Заключение.** Процедура кросслинкинга оказывает стабилизирующее физико-химическое воздействие на коллагеновые фибриллы роговичной ткани, увеличивает биохимическую устойчивость к действию протеолитических ферментов слезы и воспалительных клеток, что может быть эффективным в лечении заболеваний роговицы.

**Ключевые слова:** кросслиндинг, роговица, коллагеновые фибриллы, коллагеназа, сканирующая электронная микроскопия. ■

Офтальмохирургия. – 2014. – № 1. – С. 20-23.

### Для корреспонденции:

*Малюгин Борис Эдуардович*, докт. мед. наук, профессор, зам. ген. директора по научной работе;

*Борзенко Сергей Анатольевич*, докт. мед. наук, профессор, зав. Центром фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем;

*Мороз Зинаида Ивановна*, докт. мед. наук, профессор, зав. отделом трансплантационной и оптико-реконструктивной хирургии переднего отрезка глаза;

*Шацких Анна Викторовна*, канд. мед. наук, зав. лабораторией патологической анатомии и гистологии глаза Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем;

*Горохова Мария Валерьевна*, аспирант отдела трансплантационной и оптико-реконструктивной хирургии переднего отрезка глаза ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России

Адрес: 127486, Москва, Бескудниковский бульвар, 59а

Тел.: (499) 488-8437, (499) 488-8543

E-mail: info@mntk.ru

## ABSTRACT

**Experimental study of a donor cornea UV cross-linking enzymatic stability**

B.A. Malyugin, C.A. Borzenok, Z.I. Moroz, A.V. Shatskikh, M.V. Gorohova

*The S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Moscow, Russia*

**Purpose.** To study the stability of a crosslinking modified donor cornea to collagenase preserved in the Borzenok-Moroz solution.

**Material and methods.** Donor cornea (n=24) divided into 4 groups were the target of the research. All cornea were preserved in the Borzenok-Moroz solution for 24 hours according to standard procedure (2) before the experiment start. The first group contained only the donor cornea preserved in the Borzenok-Moroz solution (n=6). The second group included preserved donor corneas with the added riboflavin treated according to the cross-linking method (n=6). The third group was formed by preserved donor corneas treated with collagenase: result was evaluated in dynamics 24 hours (n=3) as well as 72 hours (n=3) later. The fourth group consisted of preserved donor corneas with the added riboflavin after cross-linking and treated with collagenase: result was evaluated in dynamics 24 hours (n=3) as well as 72 hours (n=3) later. Scanning electron microscopy (SEM) was carried out.

**Results.** The first group of corneas was used for reference, and according to the SEM results the corneal stroma was presented by plates of collagen protein fibers strictly oriented. In the second corneal stroma group a thickening of collagen fibrils was observed as well as a reduction of distance between

the collagen plates and a more compact stacking of plates under influence of riboflavin and ultraviolet compared to the reference group. In the third group of corneas, upon collagenase impact a destruction of collagen fibrils, a breaking of the longitudinal collagen plates orientation, a disorder of protein structure were also noted after 24 hours, the remaining coagulated protein fractions were visualized. Corneal collagen fibrils in the fourth group treated with riboflavin, ultraviolet and collagenase after 24 hours retained their structure and orientation and a more compact stacking of collagen plates was noticed compared to the third group corneas.

Dynamic evaluation of collagenase impact on the third and fourth groups after 72 hours showed that in the group 4 the impact of collagenase on the cornea was minimal, the structure and orientation of the collagen layers were preserved.

**Conclusions.** Cross-linking procedure has a stabilizing physical-chemical effect on corneal collagen fibrils, enhances biochemical resistance to proteolytic tear enzymes and inflammatory cells what can be effective in treatment of corneal diseases.

**Key words:** cross-linking, donor cornea, collagen fibrils, collagenase, scanning electron microscopy. ■

Ophthalmosurgery. – 2014. – No. 1. – P. 20-23.

Одним из наиболее тяжелых осложнений заболеваний роговицы воспалительного, дистрофического или травматического генеза является формирование фистулы роговицы, которое угрожает развитием эндофтальмита, необратимым снижением зрения или гибелью глазного яблока. Кератопластика является радикальным способом лечения данной патологии [1, 3]. В некоторых случаях, в частности при нейротрофическом кератите, при синдроме «сухого глаза» после кератопластики, нередко отмечается замедление эпителизации, что может способствовать инфицированию трансплантата или приводить к его лизису под воздействием протеолитических ферментов слезы и рецидиву фистулы [2, 6, 8].

Известно, что биохимические свойства роговицы в большей мере зависят от состояния волокон стромального коллагена, межколлагено-

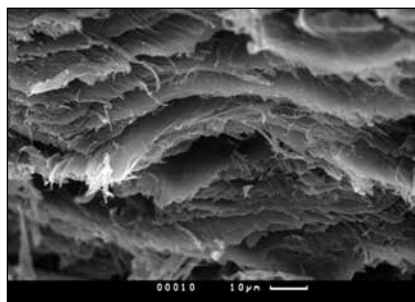
вых связей и их структурной организации [4, 5, 7, 9]. Использование методов усиления межколлагеновых связей, утолщение волокон коллагена приводит к усилению биохимических свойств роговицы. Это, в свою очередь, позволяет трансплантату роговицы противостоять воздействию агрессивных факторов слезной жидкости и воспалительных клеток, при этом значительно снижается риск развития рецидива заболевания [4, 6, 9].

Кросслинкинг роговичного коллагена является методом «склеивания» коллагеновых фибрилл, что способствует повышению биохимической стабильности роговицы. Стабилизирующий биохимический эффект кроссликинга может быть объяснен изменением структуры коллагеновых фибрилл и блокированием специфических участков, взаимодействующих с ферментами. Из литературы известно, что под влиянием ультрафиолетового излу-

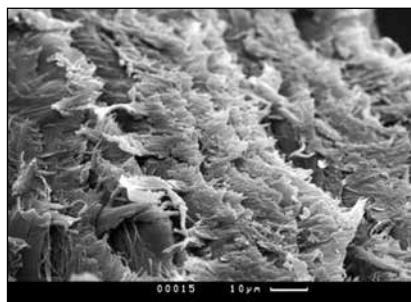
чения и рибофлавина происходит усиление поперечных внутримолекулярных связей роговичного коллагена с образованием димеров из двух α-цепей без деградации коллагеновых белков [4, 5].

В зарубежной литературе описаны эксперименты, подтверждающие эффективность данного метода, в том числе с использованием химических воздействий на роговицу. Немецкие ученые Spoerl E., Wollensak G. также проводили экспериментальные исследования, которые подтвердили повышение устойчивости роговицы после комбинированного воздействия рибофлавина и ультрафиолетового излучения к действию ферментов [7, 9]. Описание подобных экспериментов в отечественной литературе нами не найдено.

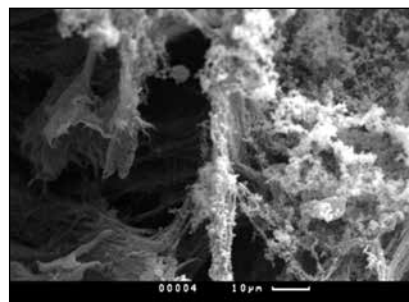
Особенностью этой работы стало исследование донорских роговиц, консервированных в среде Борзенка-Мороз и обработанных по методике кроссликинга с добавлени-



**Рис. 1.** Строма роговицы, консервированной в среде Борзенка-Мороз. Пластины строго ориентированных волокон белка коллагена, СЭМ, х1000



**Рис. 2.** Строма роговицы, обработанной рибофлавином и ультрафиолетом. Утолщение коллагеновых фибрилл, уменьшение расстояния между пластинами коллагена, более компактная укладка пластин, СЭМ, х1000



**Рис. 3.** Строма роговицы после воздействия коллагеназы через 24 часа. Разрушение коллагеновых фибрилл, нарушение продольной направленности пластин коллагена, нарушение структуры белка, СЭМ, х1000

ем протеолитических ферментов, разрушающих структуру коллагена роговицы, а именно коллагеназы *in vitro*, проведение сканирующей электронной микроскопии (СЭМ).

### ЦЕЛЬ

Изучить устойчивость донорской роговицы, консервированной в среде Борзенка-Мороз и обработанной по методике кросслинкинга, к коллагеназе.

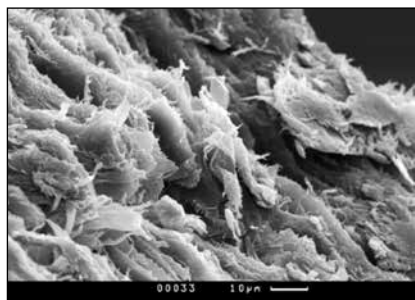
### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлись донорские роговицы (n=24), которые были распределены по 4 экспериментальным группам. Все роговицы консервировались в среде Борзенка-Мороз в течение 24 часов до начала эксперимента по стандартной методике (2). Первая группа со-

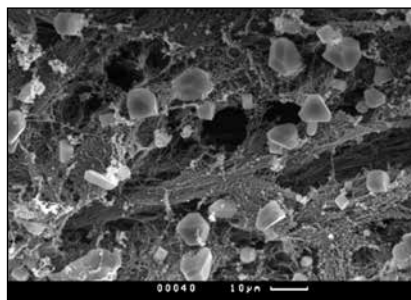
держала только консервированные в среде Борзенка-Мороз донорские роговицы (n=6). Во вторую группу входили консервированные донорские роговицы с добавлением рибофлавина, обработанные по методике кросслинкинга (n=6). Третья группа была сформирована из консервированных донорских роговиц, обработанных коллагеназой: результат оценивался в динамике через 24 часа (n=3) и через 72 часа (n=3). Четвертая группа состояла из консервированных донорских роговиц с добавлением рибофлавина, после кросслинкинга, обработанных коллагеназой: результат оценивался в динамике через 24 часа (n=3) и через 72 часа (n=3).

Особенности подготовки препаратов к сканирующей электронной микроскопии заключались в том, что роговицы обрабатывались по методике кросслинкинга: к донорским роговицам, помещенным в среду Борзенка-Мороз, добавля-

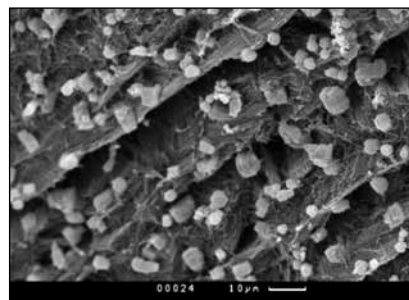
ли 1 мл 0,1%-ного раствора рибофлавина, инкубировали в течение 1 часа, после чего помещали в стерильную чашку Петри и обрабатывали ультрафиолетовым излучением с длиной волны 370 нм и мощностью 3 мВ/см<sup>2</sup> в течение 30 минут. Для облучения использовали прибор UV-X s/n 1000-401-39 (Швейцария). В процессе облучения ультрафиолетом на донорскую роговицу каждые 5 минут инстиллировали по 1 капле 0,1%-ного рибофлавина. После этого роговицы переносили во флаконы с 5 мл стерильного изотонического раствора натрия хлорида и добавляли 25 ЕД раствора коллагеназы на 24 и 72 часа. После этого препараты фиксировали в 2,5%-ном растворе глutarового альдегида, напыляли золотом и изучали методом сканирующей электронной микроскопии. Исследование проводилось на сканирующем электронном микроскопе S-3400N (Hitachi, Япония).



**Рис. 4.** Строма роговицы, обработанной рибофлавином и ультрафиолетом, после воздействия коллагеназы через 24 часа. Сохранная структура и направленность фибрилл коллагена, более компактная укладка пластин коллагена, СЭМ, х1000



**Рис. 5.** Строма роговицы после воздействия коллагеназы через 72 часа. Разрушенный коллаген стromы, направленность волокон отсутствует, оптические пустоты в зонах разрушенного коллагена, СЭМ, х1000



**Рис. 6.** Строма роговицы, обработанной рибофлавином и ультрафиолетом после воздействия коллагеназы через 72 часа. Сохранная структура и направленность пластов коллагена, СЭМ, х1000

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Роговицы первой группы являлись контрольными, и по результатам СЭМ следует, что строма роговицы была представлена пластинами строго ориентированных волокон белка коллагена (рис. 1). В строме роговиц второй группы отмечались утолщение коллагеновых фибрилл, уменьшение расстояния между пластинами коллагена, более компактная укладка пластин под воздействием рибофлавина и ультрафиолета по сравнению с контрольной группой (рис. 2). Роговицы третьей группы после воздействия коллагеназы через 24 часа также сравнивались с контрольной группой: отмечалось разрушение коллагеновых фибрилл, нарушение продольной направленности пластин коллагена, нарушение структуры белка, визуализировались оставшиеся коагулированные части белковой фракции (рис. 3). Через 24 часа фибриллы коллагена роговиц четвертой группы, обработанные рибофлавином, ультрафиолетом и коллагеназой, сохраняли свою структуру и направленность, прослеживалась более компактная укладка пластин коллагена по сравнению с роговицами третьей группы (рис. 4). Динамическая оценка действия коллагеназы в третьей и четвертой группах через 72 часа показала, что в третьей группе наблюдалось отчетливое разрушение коллагена стромы, отсутствие какой-либо направленности волокон, визуализировались оптические пустоты в зонах разрушенного коллагена (рис. 5), в то время как в 4 группе воздействие коллагеназы было минимальным с со-

хранением структуры и направленности пластов коллагена (рис. 6).

## ОБСУЖДЕНИЕ

При анализе изображений СЭМ подтвержден факт «склеивания» фибрилл и утолщения коллагеновых волокон донорской роговицы под воздействием рибофлавина и ультрафиолетового излучения, более плотная упаковка пластин коллагена, уменьшение щелевидных пространств между пластинами. Такая архитектура приводит к повышению биомеханической устойчивости ткани. При воздействии коллагеназы теряется четкая направленность волокон, а через некоторое время происходит разрушение структуры белка коллагена, что отчетливо видно при воздействии коллагеназы на нативную роговицу через 24 и особенно через 72 часа. После обработки донорской роговицы по методу кросслинкинга воздействие коллагеназы становится не столь разрушительным, сохраняется поперечная направленность пластин коллагена без признаков разрушения, с более компактной упаковкой и минимальными межщелевыми пространствами.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Процедура кросслинкинга оказывает стабилизирующее физико-химическое воздействие на коллагеновые фибриллы роговичной ткани, увеличивает биохимическую устойчивость к действию протеолитических ферментов слезы и воспалительных клеток, что может быть

эффективным в лечении заболевания роговицы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Борзенко С.А. Медико-технологические и методологические основы эффективной деятельности глазных тканевых банков России в обеспечении операций по сквозной трансплантации роговицы: Дис. ... д-ра мед. наук. – М., 2008. – С. 160-165.
2. Комах Ю.А., Мороз З.И., Борзенко С.А. Современное состояние проблемы повторной пересадки роговицы (Обзор литературы) // Офтальмохирургия. – 1997. – № 1. – С. 19-27.
3. Конаева В.Г. Современные аспекты сквозной субтотальной кератопластики: Дис. ... д-ра мед. наук. – М., 1982. – 435 с.
4. Caporossi A., Baiocchi S., Mazzotta C. et al. Parasurgical therapy for keratoconus by riboflavin/ultraviolet type A rays induced cross-linking of corneal collagen // J. Cataract Refract. Surg. – 2006. – Vol. 32. – P. 837-845.
5. Fujimori E. Cross-linking and Fluorescence Changes of Collagen by Glycation and Oxidation // Biochimica et Biophysica Acta. – 1989. – Vol. 998. – P. 105-110.
6. Lindquist T.D., McGlothlan J.S., Rotkis W.M., Chandler J.W. Indication for penetrating keratoplasty: 1980-1988 // Cornea. – 1991. – Vol. 10, № 3. – P. 210-216.
7. Spoerl E., Mrochen M., Sliney D. et al. Safety of UVA-Riboflavin cross-linking of the cornea // Cornea. – 2007. – Vol. 26, № 4. – P. 385-389.
8. Volker-Dieben H.J., D'Amato J., Kruijt P.J. The interaction of factors influencing corneal graft survival: a single centre study of 1800 consecutive corneal grafts in 16 years // Exp. Eye Res. – 1992. – Vol. 55. – Suppl. 1. – P. 177.
9. Wollensak G., Spoerl E., Seiler T. Increased Resistance of Crosslinked Cornea against Enzymatic Digestion // Current Eye Research. – 2004. – Vol. 29, № 1. – P. 35-40.

Поступила 16.04.2013

Профессиональная газета для офтальмологов и оптометристов

Российская офтальмология онлайн [www.eyepress.ru](http://www.eyepress.ru)

**МИР**  **ОФТАЛЬМОЛОГИИ**

ООО «Издательство «Офтальмология»